

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 9 月 7 日 (07.09.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/64664 A1

(51) 国際特許分類: C07D 311/16, 311/82, G01N 31/00

134-0087 東京都江戸川区清新町1丁目1番22号203  
Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/01504

(22) 国際出願日: 2001 年 2 月 28 日 (28.02.2001)

(74) 代理人: 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.);  
〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目8番7号 京橋日殖  
ビル8階 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2000-54557 2000 年 2 月 29 日 (29.02.2000) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,  
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,  
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,  
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,  
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 第一化  
学薬品株式会社 (DAIICHI PURE CHEMICALS CO.,  
LTD.) [JP/JP]; 〒103-0027 東京都中央区日本橋3丁目  
13番5号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 長野哲雄 (NAGANO, Tetsuo) [JP/JP]; 〒167-  
0032 東京都杉並区天沼1-28-15 Tokyo (JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

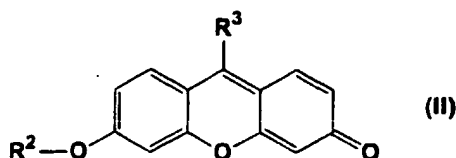
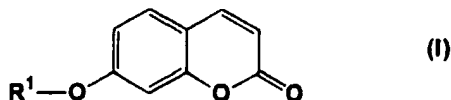
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 浦野泰照  
(URANO, Yasuteru) [JP/JP]; 〒213-0013 神奈川県川  
崎市高津区末長498 ドミール梶ヶ谷204 Kanagawa  
(JP). 瀬月内健一 (SETSUKINAI, Ken-ichi) [JP/JP]; 〒

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REAGENTS FOR THE QUANTITATION OF ACTIVE OXYGEN

(54) 発明の名称: 活性酸素測定用試薬



(57) Abstract: Compounds of the general formula (I) or (II) or  
salts thereof; and reagents for the quantitation of active oxygen,  
containing the compounds or the salts: wherein R<sup>1</sup> and R<sup>2</sup> are  
each independently optionally substituted aryl, e.g., amino- or  
hydroxyl-substituted phenyl; and R<sup>3</sup> is optionally substituted  
2-carboxyphenyl.

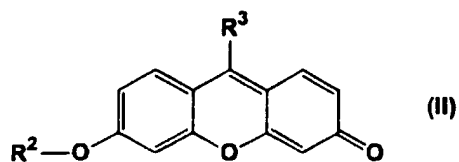
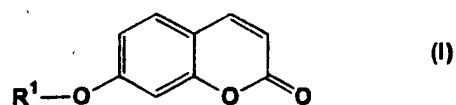
WO 01/64664 A1

[続葉有]



(57) 要約:

下記の一般式(I)又は(II)：



(式中、 $R^1$  及び  $R^2$  はそれぞれ独立に置換基を有していてもよいアリール基 (アミノ基又は水酸基で置換されたフェニル基など) を示し、 $R^3$  は置換基を有していてもよい 2-カルボキシフェニル基を示す) で表される化合物又はその塩、及び該化合物又はその塩を含む活性酸素測定用試薬。

## 明 細 書

## 活性酸素測定用試薬

## 技術分野

本発明は、活性酸素測定用試薬として有用な化合物又はその塩に関するものである。また、本発明は上記化合物又はその塩を含む活性酸素測定用試薬に関する。

## 背景技術

生体および生命現象において一酸化窒素などのフリーラジカル種が情報伝達のセカンドメッセンジャーとして作用しており、循環器系などにおいて血圧の制御を行うなど多様な生理作用を発揮していることが知られている。フリーラジカル種の一つである、活性酸素はスーパーオキサイドアニオン、過酸化水素、ヒドロキシラジカル、一重項酸素等を総称するものであるが、これらのうち、スーパーオキサイドアニオンや過酸化水素は免疫系などにおいて重要な生理作用を発揮していることが既に明らかにされている。一方ヒドロキシラジカルは血管障害や虚血後の脳障害、あるいは紫外線による DNA 修飾に関わる知見が多数報告され、病因・病態との関係で特に障害性が高い活性酸素種と考えられている。一重項酸素については、従来、その役割等についてほとんど解明されていなかったが、最近、癌治療法の一つであるフォト・ダイナミックセラピー (Photodynamic therapy) の反応種であることや、生体内の各種酸化酵素、ペルオキシダーゼが一重項酸素を生成していることを示唆する知見が得られ、重要な生理作用を担っている可能性が示唆されている。

このように活性酸素種の生体内での役割の解明の重要性が高まっているが、その測定方法については課題が多い。ヒドロキシラジカルを測定する方法については、電子スピン共鳴 (ESR) 法で測定した多数の報告があるが、ESR 法では生細胞を測定試料として使用すること自体が困難であり、個々の細胞レベルでの測定評

価は實際上不可能である。一方、活性酸素種を広く測定可能な DCHF-DA (2', 7' -ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテート、モレキュラー・プローブス社、カタログ番号 D-399) を他の活性酸素種生成の阻害剤と共に使用して顕微鏡下でヒドロキシラジカルを検出する方法も知られているが、阻害剤共存下の成績は生体内での反応とは異なる要素を含んだものになる。また DCHF-DA は、極めて自動酸化をうけやすいため、同一視野を何度も観察する必要がある場合に、自動酸化によるバックグラウンド蛍光が検出を妨害してしまう。さらに、暗所での操作を必要とするなど操作性、保存性の点で極めて不便な方法であった。

一重項酸素を測定する方法としては、化学発光法、ESR 法、発光法など十数種が知られているが、いずれも特異性及び感度が低く、信頼のおける方法とは言えない（一重項酸素の特異的検出法については Nagano, T., et al., Free radicals in Clinical Medicine, Vol. 7, pp. 35-41, 1993 などを参照のこと）。前記 DCHF-DA を、一重項酸素の測定に使用することもできるが、DCHF-DA 自体が有する問題点は解消されない。従って、活性酸素種の研究に使用可能な、特異性及び感度に優れ、かつ操作が簡便な測定方法の開発が要求されていたのである。

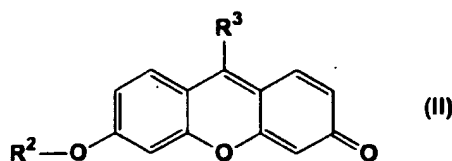
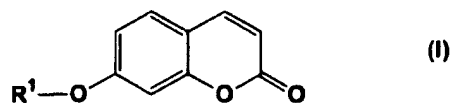
#### 発明の開示

本発明の課題は、ヒドロキシラジカル、一重項酸素などの活性酸素の測定用試薬として有用な化合物を提供することにある。また、本発明の別な課題は、上記化合物を含む活性酸素測定用試薬及び上記化合物を用いた活性酸素の測定方法を提供することにある。特に、生体内の特定の細胞や組織中に局在する活性酸素をバイオイメーjingの手法によって正確かつ簡便に測定するための試薬を提供することが本発明の課題である。

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意努力し、一重項酸素に対して特異的な検出試薬を提供することに成功した（国際公開WO 99/51586号）。本発明者らはさらに研究を続けた結果、下記の一般式(I)又は(II)で表される実質的に非蛍光性の化合物が活性酸素と生理的条件下で効率的に反応して脱アリール化

された蛍光性の化合物を与えること、並びに一般式(I)又は(II)で表される化合物をヒドロキシラジカルあるいは一重項酸素測定用試薬として用い、生細胞や生体組織中に局在する活性酸素と反応して生成する脱アリール化合物の蛍光を測定すると、極めて特異的かつ高感度に活性酸素を測定できること、さらには、一般式(I)又は(II)で表される化合物が自動酸化を全くうけないことを見出した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

すなわち本発明は、下記の一般式(I)又は(II)：



(式中、 $R^1$  及び  $R^2$  はそれぞれ独立に置換基を有していてもよいアリール基を示し、 $R^3$  は置換基を有していてもよい2-カルボキシフェニル基を示す) で表される化合物又はその塩を提供するものである。本発明の好ましい態様によれば、 $R^1$  及び  $R^2$  がアミノ基又は水酸基で置換されたフェニル基である上記化合物又はその塩；及び  $R^3$  が2-カルボキシフェニル基である上記化合物又はその塩が提供される。

別の観点からは、上記の一般式(I)又は(II)で表される化合物又はその塩を含む活性酸素測定用試薬が本発明により提供される。さらに、本発明により、活性酸素の測定方法であって、下記の工程：(A) 上記一般式(I)又は(II)で表される化合物又はその塩と活性酸素とを反応させる工程、及び(B) 上記工程(A)で生成した脱アリール化合物（上記一般式(I)において  $R^1$  が水素原子である化合物又は上記一般式(II)において  $R^2$  が水素原子である化合物）又はその塩の蛍光を測定する工程を含む方法が提供される。

## 図面の簡単な説明

第1図は、例3で得られた本発明の化合物(ss-3F) 10  $\mu$ M 溶液の励起スペクトル及び蛍光スペクトルを示す。

第2図は、例3で得られた本発明の化合物(ss-3F) 10  $\mu$ M 溶液に一重項酸素発生系である EP-1 を添加して蛍光強度の時間変化を測定した結果を示す。

第3図は、第2図に示した反応終了後の溶液の励起スペクトル及び蛍光スペクトルを示す。

第4図は、例3で得られた本発明の化合物(ss-3F) 10  $\mu$ M 溶液にヒドロキシラジカルの発生系である過酸化水素及び過塩素酸第一鉄を加えて蛍光強度の時間変化を測定した結果を示す。

第5図は、リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 中に溶解した本発明の化合物(ss-3F) 10  $\mu$ M の吸光スペクトルを示す。

第6図は、例3で得られた本発明の化合物(ss-3F)を含む溶液を HPLC で分析した結果を示す。図中、(A) 10  $\mu$ M ss-3F 溶液；(B) 10  $\mu$ M ss-3F 溶液に最終濃度が 5 mM になるように EP-1 を加えて、37°C で 8 時間反応させた反応溶液；(C) 10  $\mu$ M ss-3F 溶液に最終濃度が 1 mM になるように過酸化水素を加え、さらに最終濃度が 500  $\mu$ M になるように過塩素酸第一鉄を加えて、約 3 時間室温に放置した溶液；(D) 1  $\mu$ M フルオレセイン溶液の結果を示す。

第7図は、例1で得られた本発明の化合物(ss-3) 10  $\mu$ M 溶液の励起スペクトル及び蛍光スペクトルを示す。

第8図は、例1で得られた本発明の化合物(ss-3) 10  $\mu$ M 溶液と一重項酸素の反応終了後の励起スペクトル及び蛍光スペクトルを示す。

第9図は、本発明の化合物(ss-1F 及び ss-3F) と HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> との反応性を検討した結果を示す。図中、(A) は ss-1F、(B) は ss-3F の結果を示す。図中の数字は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度を示す。

発明を実施するための最良の形態

日本国特許出願第 2000-54557 号明細書の開示を参照として全て本明細書の開示に含める。

$R^1$  又は  $R^2$  が示すアリール基としては、例えば、環構成原子数が 6 個から 14 個程度の単環性、二環性、又は三環性アリール基を用いることができる。好ましくはフェニル基又はナフチル基、より好ましくはフェニル基を用いることができる。アリール基は環上に 1 個又は 2 個以上の置換基を有していてもよい。2 個以上の置換基を有する場合には、それらは同一でも異なってもよい。置換基の種類及び置換位置は特に限定されないが、例えば、 $C_{1-6}$  アルキル基（アルキル基は直鎖状、分枝鎖状、環状、又はそれらの組み合わせのいずれでもよい。アルキル部分を有する他の置換基のアルキル部分についても同様である。）、 $C_{1-6}$  ハロアルキル基、 $C_{1-6}$  アルケニル基、 $C_{1-6}$  アルコキシ基、ハロゲン原子（ハロゲン原子としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子のいずれでもよい）、シアノ基、ニトロ基、置換基を有することもあるアミノ基、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基、 $C_{1-6}$  アルカノイル基、 $C_{1-6}$  ハロアルカノイル基、アロイル基、水酸基、アルキレンジオキシ基などを置換基として用いることができる。

$R^1$  又は  $R^2$  としては置換フェニル基が好ましく、モノ置換フェニル基がより好ましい。モノ置換フェニル基としては、無置換のアミノ基又は水酸基を有するフェニル基が特に好適である。置換基の置換位置としては、オルト位又はパラ位が好ましい。 $R^3$  が示す 2-カルボキシフェニル基のベンゼン環は 1 個又は 2 個以上の置換基を有していてもよい。2 個以上の置換基を有する場合には、それらは同一でも異なってもよい。ベンゼン環上の置換基としては上記のアリール基について説明した基を用いることができ、 $R^3$  としては無置換の 2-カルボキシフェニル基が好ましい。

上記一般式(I)又は(II)の化合物は塩として存在する場合がある。塩としては、塩基付加塩、酸付加塩、アミノ酸塩などを挙げることができる。塩基付加塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩など

の金属塩、アンモニウム塩、又はトリエチルアミン塩、ピペリジン塩、モルホリン塩などの有機アミン塩を挙げることができ、酸付加塩としては、例えば、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩などの鉱酸塩、メタンスルホン酸塩、パラトルエンスルホン酸塩、クエン酸塩、シュウ酸塩などの有機酸塩を挙げることができる。アミノ酸塩としてはグリシン塩などを例示することができる。もっとも、本発明の化合物の塩はこれらに限定されることはない。

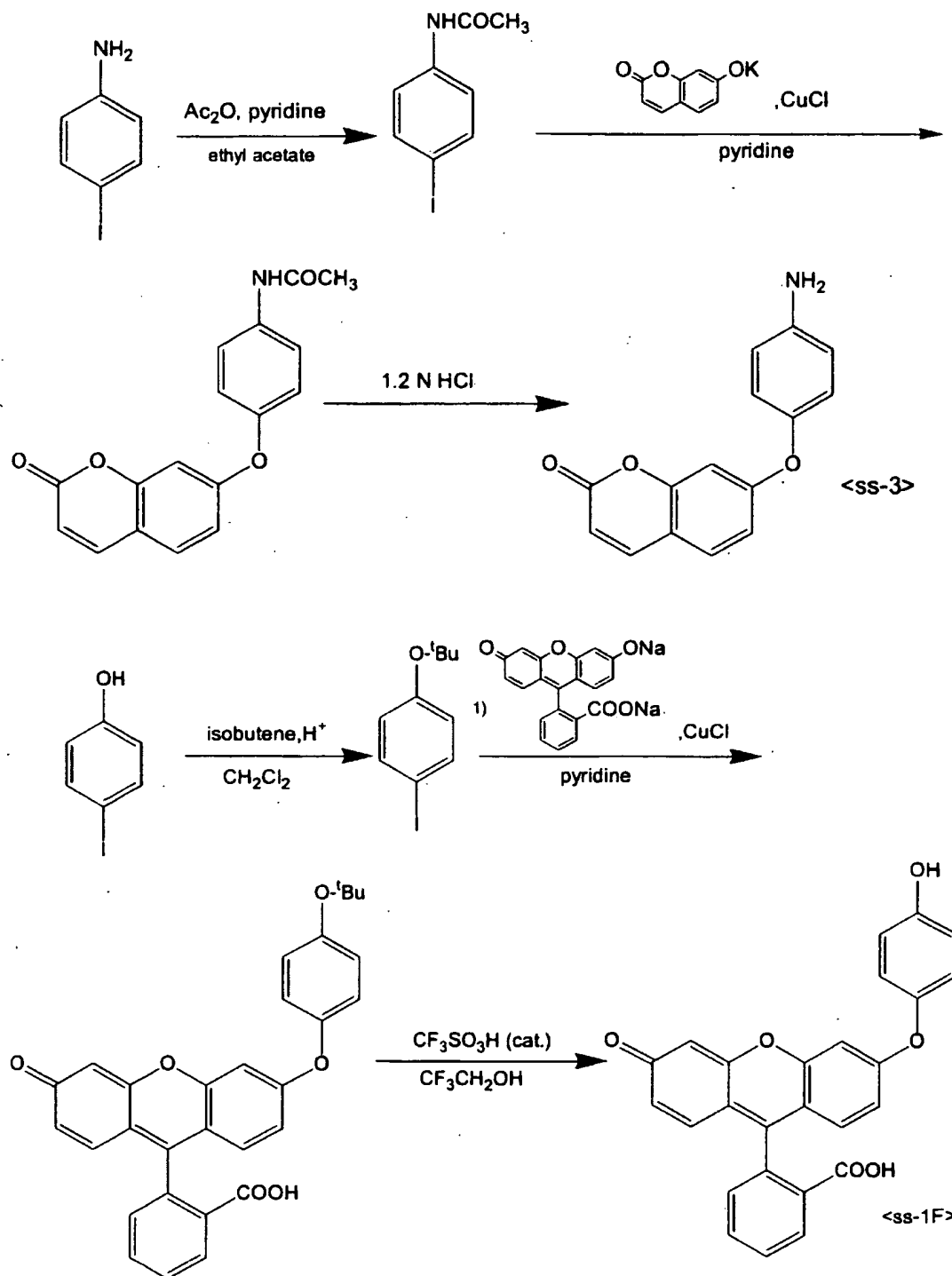
これらのうち、生理学的に許容される水溶性の塩は、本発明の試薬及び測定方法に好適に使用できる。また、遊離形態の一般式(I)又は(II)の化合物又はその塩は、水和物又は溶媒和物として存在する場合もあるが、これらの物質はいずれも本発明の範囲に包含される。溶媒和物を形成する溶媒の種類は特に限定されないが、例えば、エタノール、アセトン、イソプロパノールなどの溶媒を例示することができる。

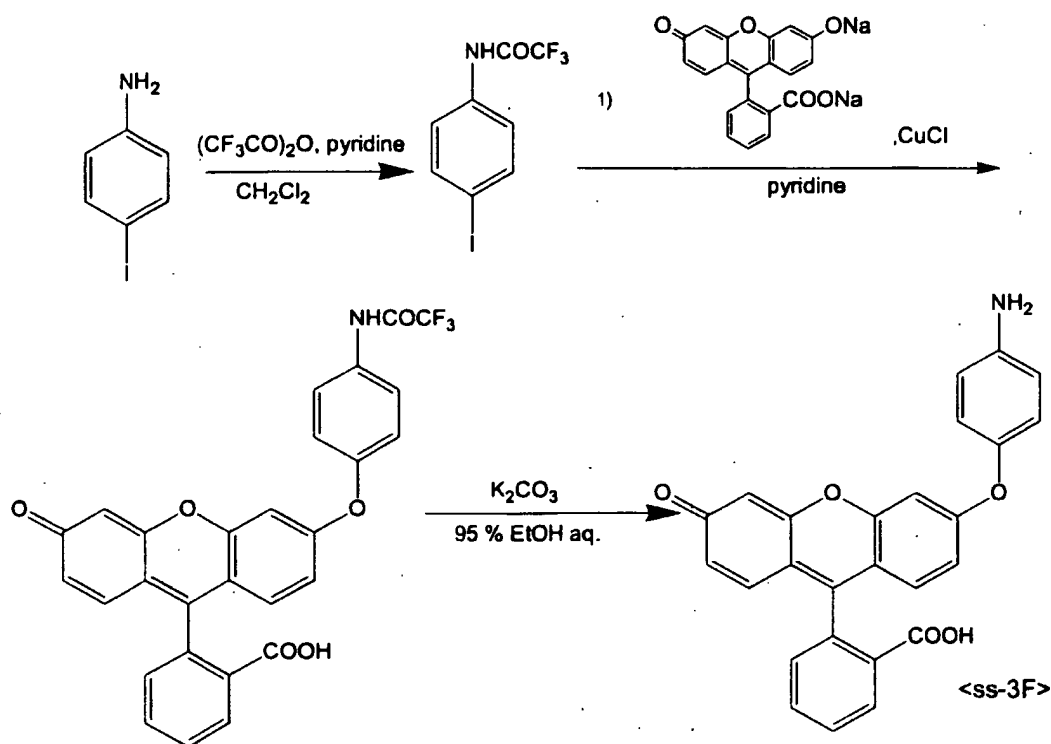
一般式(I)又は(II)で表される化合物は、置換基の種類に応じて1個または2個以上の不斉炭素を有する場合があります、光学異性体又はジアステレオ異性体などの立体異性体が存在する場合がある。純粋な形態の立体異性体、立体異性体の任意の混合物、ラセミ体などはいずれも本発明の範囲に包含される。なお、本発明の式(II)の化合物は分子内でラクトン環を形成することがあるが、ラクトン環を形成した化合物も本発明の範囲に包含されることは言うまでもない。また、上記ラクトン形成に基づく光学活性体も本発明の範囲に包含される。

一般式(I)又は(II)で表される本発明の化合物は、一般的には、対応のクマリン化合物（一般式(I)において  $R^1$  が水素原子である化合物）又はフルオレセイン化合物（一般式(II)において  $R^2$  が水素原子である化合物）をアリール化することにより製造することができる。一般的には、クマリン化合物又はフルオレセイン化合物のアルカリ金属塩を調製しておき、適当な溶媒中で塩化銅の存在下にヨウ化アリール化合物と反応させればよい。本発明の上記一般式(I)又は(II)で表される化合物の代表的化合物の製造方法を下記のスキームに示す。また、本明細書の実施例には、このスキームに記載した製造方法がより詳細かつ具体的に示されている。



る。従って、当業者は実施例の具体的説明を基にして、出発原料及び反応試薬を適宜選択し、必要に応じて反応条件や工程を適宜変更ないし修飾することにより、本発明の化合物をいずれも製造することが可能である。



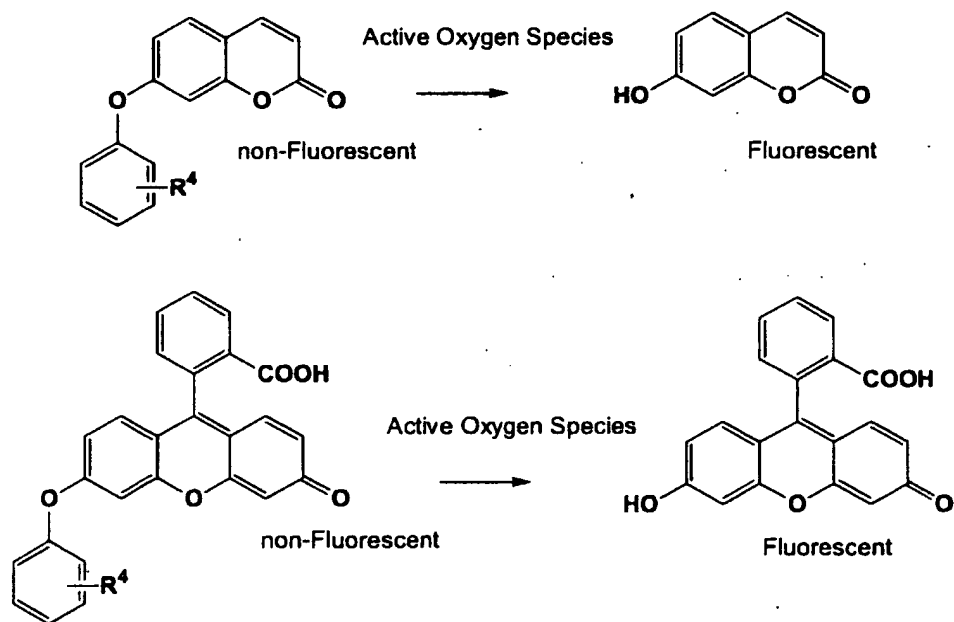


なお、反応工程において特定の官能基を必要に応じて保護して反応を行うことにより、目的物を効率的に製造することができる場合があるが、保護基については、プロテクティブ・グループス・イン・オーガニック・シンセシス (Protective Groups in Organic Synthesis, T.W.Greene, John Wiley & Sons, Inc., 1981) などに詳しく説明されており、当業者は適宜の保護基を選択することが可能である。

また、上記製造法における生成物の単離、精製は通常の有機合成で用いられる方法、例えば濾過、抽出、洗浄、乾燥、濃縮、結晶化、各種クロマトグラフィー等を適宜組み合わせ行うことができる。また、上記工程における製造中間体は、特に精製することなく次の反応に供することも可能である。本発明の化合物の塩を製造する場合には、上記製造法においてそれぞれの化合物の塩が得られる場合はそのまま精製すればよければよく、遊離形態の化合物が得られる場合には、遊離形態の化合物を適当な溶媒に溶解又は懸濁した後、塩基を加えて塩を形成させ、

必要に応じて精製を行えばよい。

上記一般式(I)又は(II)で表される本発明の化合物又はその塩は、緩やかな条件下、例えば生理的条件下で活性酸素と反応して、脱アリール体であるクマリン化合物（一般式(I)において  $R^1$  が水素原子である化合物に相当する）若しくはフルオレセイン化合物（一般式(II)において  $R^2$  が水素原子である化合物に相当する）又はそれらの塩を与える性質を有している。一般式(I)又は(II)の化合物又はその塩は実質的に非蛍光性であり、一方、脱アリール化されたクマリン化合物若しくはフルオレセイン化合物又はそれらの塩は高強度の蛍光を発する性質を有している。従って、上記式(I)又は(II)で表される化合物又はその塩を活性酸素と反応させた後、脱アリール化された化合物又はその塩の蛍光を測定することによって、活性酸素を選択的かつ高感度に測定することが可能である。



(式中、 $R^4$ はp-アミノ基、o-アミノ基、p-ヒドロキシ基、o-ヒドロキシ基などを示し、活性酸素種(active oxygen species)は一重項酸素又はヒドロキシラジカルなどである)

本発明の試薬により測定可能な活性酸素の種類は特に限定されず、スーパーオキシドアニオン、ヒドロキシラジカル、一重項酸素、過酸化水素などのいずれも測定可能であるが、特に一重項酸素及びヒドロキシラジカルを高感度かつ選択的に測定することができる。例えば、一般式(I)又は(II)の化合物又はその塩を活性酸素測定用試薬として用いると、個々の細胞や特定の組織中に局在する活性酸素を正確にかつ簡便に測定できる。

本明細書において用いられる「測定」という用語は、定量、定性、又は診断などの目的で行われる測定、検査、検出などを含めて、最も広義に解釈しなければならない。本発明の活性酸素の測定方法は、一般的には、(A)上記一般式(I)又は(II)で表される化合物又はその塩と活性酸素とを反応させる工程、及び(B)上記工程(A)で生成した脱アリール化合物(上記一般式(I)において $R^1$ が水素原子である化合物又は上記一般式(II)において $R^2$ が水素原子である化合物に相当する)又はその塩の蛍光を測定する工程を含んでいる。

脱アリール化された化合物又はその塩の蛍光の測定は通常の方法で行うことができ、インビトロで蛍光スペクトルを測定する方法や、バイオイメーシングの手法を用いてインビボで蛍光スペクトルを測定する方法などを採用することができる。例えば、定量を行う場合には、常法に従って予め検量線を作成しておくことが望ましいが、定量的なヒドロキシラジカルの発生系として、例えば、ガンマラジオリシス法などを利用することができ、一重項酸素の発生系として、例えば、ナフタレンエンドパーオキシド系(Saito, I., et al., J. Am. Chem. Soc., 107, pp. 6329-6334, 1985)などを利用することができる。本発明の試薬は細胞内に取り込まれる性質を有しており、個々の細胞内に局在する活性酸素をバイオイメーシング手法により高感度に測定できる。

また、本発明の化合物又はその塩の特徴を別の面からみれば、ペルオキシダーゼなど酵素反応に活性酸素が関与する酵素の酵素活性を特異的に測定できることから、本発明の化合物又はその塩を含む試薬はペルオキシダーゼなどの活性酸素に関与する酵素の酵素活性を測定するための試薬として有用である。

本発明の活性酸素測定用試薬としては、上記式(I)又は(II)で表される化合物又はその塩をそのまま用いてもよいが、必要に応じて、試薬の調製に通常用いられる添加剤を配合して組成物として用いてもよい。例えば、生理的環境で試薬を用いるための添加剤として、溶解補助剤、pH調節剤、緩衝剤、等張化剤などの添加剤を用いることができ、これらの配合量は当業者に適宜選択可能である。これらの組成物は、粉末形態の混合物、凍結乾燥物、顆粒剤、錠剤、液剤など適宜の形態の組成物として提供される。

#### 実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

例1：ss-3（一般式(I)においてR<sup>1</sup>がp-アミノフェニル基である化合物）の合成

##### 1) 4-ヨードアセトアニリドの合成

4-ヨードアニリン 11.0 g (50.4 mmol) を酢酸エチル 60 mL に溶かし、そこに無水酢酸 10 mL (10.8 g, 106 mmol)、ピリジン 7.8 mL (7.65 g, 99.4 mmol) を加え、CaCl<sub>2</sub> 管をつけて室温下 2 時間攪拌した。溶媒を減圧溜去することにより、4-ヨードアセトアニリドを得た（収量：13.0 g, 収率：99.0 %）。

m. p. 174.5 °C-175.5 °C。

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz Acetone-d<sub>6</sub>) ; δ 2.04(s, 3H)、7.46(dd, J=9.0 Hz, 2.2 Hz, 1H)、7.60(dd, J=9.0 Hz, 2.2 Hz, 1H)、9.21(br, 1H)

EI Mass(M)<sup>+</sup>=261

##### 2) pre ss-3（アセチル）の合成

カリウム t-ブトキシド 123 mg (1.10 mmol) をベンゼン 8 mL/メタノール 3 mL の混合液に溶かした。その後、7-ヒドロキシクマリン 196 mg (1.21 mmol) を加え攪拌して溶かした。その後、減圧溜去により溶媒を除き、7-ヒドロキシクマリ

ンカリウム塩を得た。この 7-ヒドロキシクマリンカリウム塩の入った 25 mL ナスフラスコに 4-ヨードアセトアニリド 1.11g (4.26 mmol) をピリジン 12 mL に溶かした溶液と、塩化第一銅 124 mg (1.25 mmol) とを加え、アルゴン気流下で 9 時間 45 分間加熱還流を行った。室温まで放冷してから、反応液に水 55 mL を加え、さらに濃塩酸を加えて酸性にした。酢酸エチル (75 mL x4) で抽出し、集めた有機層を飽和食塩水で洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥後、溶媒を減圧溜去した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (2 回、展開溶媒はいずれも酢酸エチルのみ) により精製し、pre ss-3 (アセチル) を黄色結晶として得た (収量: 68.7 mg, 収率: 21.2 %)。

m. p. 197.0 °C-199.0 °C。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz Acetone- $d_6$ ) ;  $\delta$  2.08(s, 3H)、6.27(d,  $J=9.5$  Hz, 1H)、6.79(d,  $J=2.4$  Hz, 1H)、6.92(dd,  $J=8.6$  Hz, 2.4 Hz, 1H)、7.09(d,  $J=9.0$  Hz, 2H)、7.65(d,  $J=8.6$  Hz, 1H)、7.74(d,  $J=9.0$  Hz, 2H)、7.93(d,  $J=9.5$  Hz, 1H)

EI Mass(M) $^+$ =295

### 3) ss-3 の合成

pre ss-3 (アセチル) 67 mg (0.227 mmol) を 1.2 規定塩酸 20 mL に加え、完全に密閉系にしてから 3 時間加熱還流し、その後 1 時間 30 分間室温で攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 65 mL を加え、酢酸エチル (75 mL x4) で抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥後、溶媒を減圧溜去した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒; ジクロロメタン/酢酸エチル=3/1) により精製し、ss-3 を黄色結晶として得た (収量: 38.0 mg, 収率: 66.2 %)。

m. p. 132.5 °C-133.5 °C。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz Acetone- $d_6$ ) ;  $\delta$  4.57(br, 2H)、6.10(d,  $J=9.5$  Hz, 1H)、6.60-6.78(m, 5H)、7.47(d,  $J=8.6$  Hz, 1H)、7.77(d,  $J=9.5$  Hz, 1H)

EI Mass(M) $^+$ =253

例 2 : ss-1F (一般式(II)において  $R^2$  が p-ヒドロキシフェニル基であり、 $R^3$  が 2-カルボキシフェニル基である化合物) の合成

1) 4-tert-ブトキシヨードベンゼンの合成

4-ヨードフェノール 18.7g (85.1 mmol) をジクロロメタン 150 mL に溶かし、氷冷下で飽和するまでイソブテンをバブルした。その後、濃硫酸 10 滴を加え室温で一晩攪拌した。反応液を 2 規定水酸化ナトリウム水溶液 50 ml で 2 回洗い、有機層を  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥後、溶媒を減圧溜去することにより 4-tert-ブトキシヨードベンゼンを白色結晶として得た (収量 : 16.6g, 収率 : 70.7 %)。

m. p. 40.0°C-41.5 °C。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ ) ;  $\delta$  1.33 (s, 9H)、6.75 (dd,  $J=9.0$  Hz, 2.4Hz, 2H)、7.55 (dd,  $J=9.0$  Hz, 2.4Hz, 2H)

EI Mass (M) $^+$ =276

2) pre ss-1F (t-ブチル) の合成

フルオレセインナトリウム 3.75 g (9.97 mmol)、塩化第一銅 3.92 g (39.6 mmol)、4-tert-ブトキシヨードベンゼン 8.05 g (29.2 mmol) をピリジン 50 ml に加え、アルゴン気流下で 10 時間 15 分加熱還流した。反応液に水 50 ml、濃塩酸 80 ml を加え酸性にした後、ジクロロメタンで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥した後、減圧濃縮した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 ; 酢酸エチル/n-ヘキサン=1/1) で精製し、pre ss-1F (t-ブチル) を黄色固体として得た (収量 : 19.6 mg, 収率 : 0.4 %)。

m. p. 136.0°C-138.0°C

$^1\text{H-NMR}$  (300MHz  $\text{CD}_3\text{CN}$ ) ;  $\delta$  1.33 (s, 9H)、6.62-6.82 (m, 6H)、7.06 (m, 4H)、7.30 (d,  $J=7.5$  Hz, 1H)、7.71-7.83 (m, 2H)、7.98 (d,  $J=6.4$  Hz, 1H)

FAB Mass (M+1) $^+$ =481

## 3) ss-1F の合成

pre ss-1F (t-ブチル) 9.8 mg (20.4  $\mu$ mol) を 2,2,2-トリフルオロエタノール 10mL に溶かし、氷冷下トリフルオロメタンスルホン酸の希釈液を 5 滴加え、アルゴン気流下、氷冷下で 25 分間攪拌した。反応終了後、反応液にジクロロメタン 40mL を加え、水 (2 回)、飽和食塩水で洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥した後、溶媒を減圧溜去し、ss-1 を黄色結晶として得た (収量 : 6.6 mg, 収率 : 76.9 %)。

m. p. 127.0°C-129.0 °C。

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz Acetone- $d_6$ ) ;  $\delta$  6.48-6.67 (m, 6H)、6.79 (d,  $J=9.0$  Hz, 2H)、6.87 (d,  $J=9.0$  Hz, 2H)、7.17 (d,  $J=7.5$  Hz, 1H)、7.58-7.71 (m, 2H)、7.86 (d,  $J=7.5$  Hz, 1H)

FAB Mass ( $M+1$ ) $^+$ =425

例 3 : ss-3F (一般式(II))において  $R^2$  が p-アミノフェニル基であり、 $R^3$  が 2-カルボキシフェニル基である化合物) の合成

## 1) 4-ヨードトリフルオロアセトアニリドの合成

4-ヨードアニリン 25.0 g (114 mmol) のジクロロメタン 100 ml 溶液に、トリフルオロ無水酢酸 36.0 ml (216 mmol, 45.0 g) 及びピリジン 17.0 ml (210 mmol, 16.6 g) を氷冷下で加え、発煙及び発熱が終結するまで氷冷下攪拌した。その後、直ちに室温に戻し、引き続き 19 時間攪拌した。溶媒を減圧溜去した後、シリカゲルクロマトグラフィー (溶出液 : 酢酸エチル) で精製し、4-ヨードトリフルオロアセトアニリドを薄褐色固体として得た (収量 : 34.1 g, 収率 : 94.8%)。

m. p. 148.5-149.0°C

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{TMS}$ ) ;  $\delta$  7.35 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.71 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.90 (br, 1H)

EI Mass ( $M$ ) $^+$  = 315

## 2) N'-トリフルオロアセチル-ss-3F(TFA 塩)の合成



フルオレセインナトリウム 3.77 g (10.0 mmol) をジメチルアセトアミド 50 ml に溶かし、20 分間攪拌した。これに 4-ヨードトリフルオロアセトアニリド 12.8 g (40.5 mmol) のピリジン 60 ml 溶液を混合し、さらに塩化銅 2.55 g (25.8 mmol) を加えて、アルゴン気流下 9 時間加熱還流した。この反応溶液を室温まで放冷した後、水 100 ml を加え、さらに濃塩酸 65 ml を加えて酸性にした。これを酢酸エチルで 3 回抽出し、有機層を集めて飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウム上で乾燥させて溶媒を減圧溜去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（溶出液：酢酸エチル／*n*-ヘキサン = 1 / 1）で精製し、プレ ss-3F (TFA) を黄色固体として得た（収量：76.6 mg, 収率：1.48 %）。

m. p. 116.5–118.5°C

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) ; δ 6.57–6.87 (m, 6H), 7.18 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.70–7.82 (m, 4H), 8.00 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H)

FAB Mass (*M*+1)<sup>+</sup> = 520

### 3) ss-3F の合成

プレ ss-3F (TFA) 76.6 mg (0.148 mmol) 及び無水炭酸カリウム 90.3 mg をエタノール 20 ml 及び水 1.2 ml の混合液に溶解して 4 時間加熱還流した。この溶液を室温まで放冷した後、エタノール及び水を減圧溜去した。残渣に水 20 ml を加え、さらに 2 N 塩酸 10 ml を加えて酸性にした (pH 1)。これをジクロロメタンで 2 回抽出し、有機層を集めて溶媒を減圧溜去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（溶出液：酢酸エチル／*n*-ヘキサン = 1 / 1）で精製し、ss-3F を黄色固体として得た（収量：13.6 mg, 収率：21.8 %）。

m. p. 153.5–155.0°C

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>) ; δ 6.60–6.89 (m, 10H), 7.29 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.72 (td, *J* = 7.5 Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.80 (td, *J* = 7.5 Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.98 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H)

FAB Mass (*M*+1)<sup>+</sup> = 424

## 例 4

## 1) 蛍光スペクトル

例 3 で得られた ss-3F を DMF に 10 mM の濃度に溶解した後、100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) を加えて最終濃度が  $10\ \mu\text{M}$  になるように溶解した。この  $10\ \mu\text{M}$  ss-3F 溶液の励起スペクトル及び蛍光スペクトルを、日立製蛍光光時計 F4500 を用いて測定した。この際、スリット幅は励起スペクトル及び蛍光スペクトルともに 2.5 nm、フォトマル電圧は 950 V を用い、特に言及しない場合には励起波長 490 nm、蛍光波長 510 nm で測定した。結果を第 1 図に示す。第 1 図より明らかなように、ss-3F それ自体は蛍光を有さないことが確認された。

次に、ss-3F と一重項酸素との反応を調べるために、 $10\ \mu\text{M}$  ss-3F 溶液に最終濃度が 1 mM、2 mM 及び 5 mM になるように EP-1 (一重項酸素の発生系であるナフタレンエンドパーオキシド系化合物: Saito, I., et al., J. Am. Chem. Soc., 107, pp. 6329-6334, 1985) のジメチルホルムアミド (DMF) 溶液を加えて、蛍光強度の時間変化を測定した (EP-1 系)。ただし、この時の溶液の温度は  $37^{\circ}\text{C}$  とした。結果を第 2 図に示す。また、反応終了後の溶液の励起スペクトル及び蛍光スペクトルを上記と同様の条件で測定した。結果を第 3 図に示す。第 2 図から明らかなように、ss-3F と EP-1 を共存させた場合、EP-1 の濃度及び時間依存的に蛍光強度の上昇が認められた。さらに第 3 図においても蛍光の発生が認められ ss-3F が一重項酸素との反応により蛍光を生じることが確認された。

さらに、ss-3F とヒドロキシラジカルとの反応を調べるために、 $10\ \mu\text{M}$  ss-3F 溶液に最終濃度が 1 mM になるように過酸化水素を加え、その後 1 回につき最終濃度が  $100\ \mu\text{M}$  になるように計 5 回、過塩素酸第一鉄を加え、蛍光強度の時間変化を測定した (Fenton 系)。結果を第 4 図に示す。第 4 図から明らかなように、過塩素酸第一鉄添加の度に蛍光強度の上昇が認められ、ss-3F がヒドロキシラジカルとの反応により、蛍光を生じることが確認された。

## 2) 吸光スペクトル

ss-3F を DMF に 10 mM の濃度に溶解した後、100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) を加えて最終濃度が 10  $\mu$ M になるように溶解した。この 10  $\mu$ M ss-3F 溶液の吸光スペクトルを測定した。結果を第 5 図に示す。ss-3F は 455 nm 付近に吸収極大を有することが確認された。

## 3) HPLC スペクトル

以下に示す溶液を HPLC で分析した。カラムは XTerra™ RP<sub>18</sub> 5  $\mu$ m (4.6  $\times$  250 mm) を使用し、溶出液はアセトニトリル/0.1M NaHCO<sub>3</sub> 水溶液=1/1 (0.1 %のトリフルオロ酢酸を含む)、溶出速度は 1 ml/分とし、460 nm の吸光度を測定した。

(A) 10  $\mu$ M ss-3F 溶液

(B) 10  $\mu$ M ss-3F 溶液に最終濃度が 5 mM になるように EP-1 を加えて、37°C で 8 時間反応させた反応溶液

(C) 10  $\mu$ M ss-3F 溶液に最終濃度が 1 mM になるように過酸化水素を加え、さらに最終濃度が 500  $\mu$ M になるように過塩素酸第一鉄を加えて、約 3 時間室温に放置した溶液

(D) 1  $\mu$ M フルオレセイン溶液

ss-3F 単独の場合 (A)、保持時間 3.0 分にピークが検出された。一重項酸素発生系である (B) では (A) と異なる 2.3 分のピークが、ヒドロキシラジカル発生系である (C) では (A) と異なる 2.3 分のピークが検出された。(B)、(C) で検出されたピークは、フルオレセイン (D) のピーク 2.3 分と一致した。以上により、ss-3F は一重項酸素あるいはヒドロキシラジカルと反応し、フルオレセインが生成することが確認された。

例 5.:

1) 蛍光スペクトル

例 1 で得られた ss-3 を、励起波長は 370 nm、蛍光波長は 450 nm で測定する以外は例 4 の 1) と同様の条件で蛍光スペクトルを測定した。EP-1 が存在しない場合の結果を第 7 図に、EP-1 との反応終了後の溶液の蛍光スペクトルの結果を第 8 図に示した。第 7 図及び第 8 図より明らかなように、ss-3 それ自体は実質的に蛍光を有さず、一重項酸素との反応により蛍光を生じることが確認された。

例 6 : 各活性酸素種との反応 (特異) 性の比較

本発明の化合物 ss-1F、ss-3F について試験した。活性酸素種検出用試薬として市販されている DCHF-DA (2',7'-ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテート; モレキュラー・プローブス社、D-399) を加水分解することにより生成する DCHF (2',7'-ジクロロジヒドロフルオレセイン) を対照として使用した。DCHF-DA をステファンらの方法 (Stephen L. Hempel et al., Free Radical Biology & Medicine, 27, 146-159, 1999) に準じてアルカリ性下、加水分解して DCHF を得た。即ち、暗所において DCHF-DA を pH 12 の水酸化ナトリウム水溶液で 30 分間処理後、直ちに 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) で 10  $\mu$ M となるよう希釈した。10  $\mu$ M DCHF 溶液は調整後、直ちに試験に使用した。ss-1F、ss-3F も 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) で 10  $\mu$ M 溶液を調整し試験に使用した。ss-1F、ss-3F、DCHF のそれぞれを a~f の条件で 30 分 (f のみ 2 時間 30 分) 処理し、処理前後の蛍光強度の変化を測定した。蛍光強度の測定は例 4 と同様の条件で行なった。蛍光プローブの濃度はいずれも 10  $\mu$ M (100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.4) とした。結果を表 1 に示す。

表 1

活性酸素種	ss-1F	ss-3F	DCHF
ヒドロキシラジカル <sup>(a)</sup>	$3.3 \times 10^2$	$6.0 \times 10^2$	$4.8 \times 10^3$
一重項酸素 <sup>(b)</sup>	4.8	8.7	26
スーパーオキサイド <sup>(c)</sup>	8.3	5.6	67
過酸化水素 <sup>(d)</sup>	1.8	<1.0	$1.9 \times 10^2$
一酸化窒素 <sup>(e)</sup>	6.0	<1.0	$1.5 \times 10^2$
自動酸化 <sup>(f)</sup>	<1.0	<1.0	$1.6 \times 10^3$

(a) 過塩素酸鉄(II) 100  $\mu$ M、過酸化水素 1 mM を加えた。

(b) EP-1 100  $\mu$ M を加えた。

(c)  $\text{KO}_2$  100  $\mu$ M を加えた。

(d) 過酸化水素 1 mM を加えた。

(e)  $\text{NOCl}_3$  100  $\mu$ M を加えた。

(f) 蛍光灯直下に 2 時間 30 分置いておいた。

DCHF はヒドロキシラジカル (条件 a) をはじめ、その他の活性酸素種ともよく反応した。また、本来反応することが望ましくない自動酸化 (条件 f) に対する反応性も同様に強かった。一方、ss-1F および ss-3F は自動酸化 (条件 f) を全く受けず、さらにヒドロキシラジカルに強い反応性を有していた。

#### 例 7 : ペルオキシダーゼ活性の特異的な検出

本発明の化合物 ss-1F あるいは ss-3F を DMF に 10 mM の濃度に溶解した後、100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4) を加えて最終濃度が 10  $\mu$ M になるよう溶解した。この ss-1F あるいは ss-3F 溶液に、最終濃度が 0.2  $\mu$ M になるよう西洋ワサビペルオキシダーゼの 100 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) を加え、さらに最終濃度が 0、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.0、5.0  $\mu$ M になるよう過酸化水素を添加し、

直ちに蛍光スペクトルを測定した。なお、蛍光波長 515 nm で測定する以外は例 4 の 1) と同様の条件で測定した。結果を第 9 図に示した。第 9 図より明らかなように ss-1F および ss-3F とも、過酸化水素濃度 0~5.0  $\mu$ M の範囲で濃度依存的な蛍光強度の上昇が認められた。

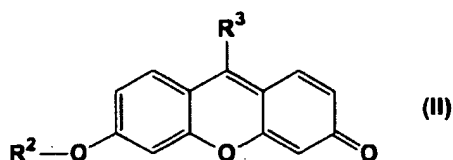
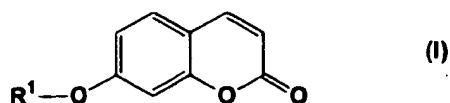
既に例 6 の結果より、ss-1F および ss-3F は過酸化水素自体とは反応せず、また自動酸化も受けないことが分かっている。従って、本例 7 の結果より、本発明の化合物はペルオキシダーゼ活性のみを特異的に測定できることが確認された。

#### 産業上の利用可能性

本発明の化合物は、ヒドロキシラジカル、一重項酸素などの活性酸素の測定用試薬として有用である。本発明の化合物を含む活性酸素測定用試薬及び上記化合物を用いた活性酸素の測定方法は、特に生体内の特定の細胞や組織中に局在する活性酸素をバイオイメーjingの手法によって正確かつ簡便に測定するための試薬及び測定方法として有用である。

## 請求の範囲

1. 下記の一般式(I)又は(II)：



(式中、R¹及びR²はそれぞれ独立に置換基を有していてもよいアリール基を示し、R³は置換基を有していてもよい2-カルボキシフェニル基を示す) で表される化合物又はその塩。

2. R¹及びR²がアミノ基又は水酸基で置換されたフェニル基である請求の範囲第1項に記載の化合物又はその塩。

3. R³が2-カルボキシフェニル基である請求の範囲第1項又は第2項に記載の化合物又はその塩。

4. 請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載の化合物又はその塩を含む活性酸素測定用試薬。

5. 活性酸素の測定方法であって、下記の工程：

(A) 請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載の化合物又はその塩と活性酸素とを反応させる工程、及び

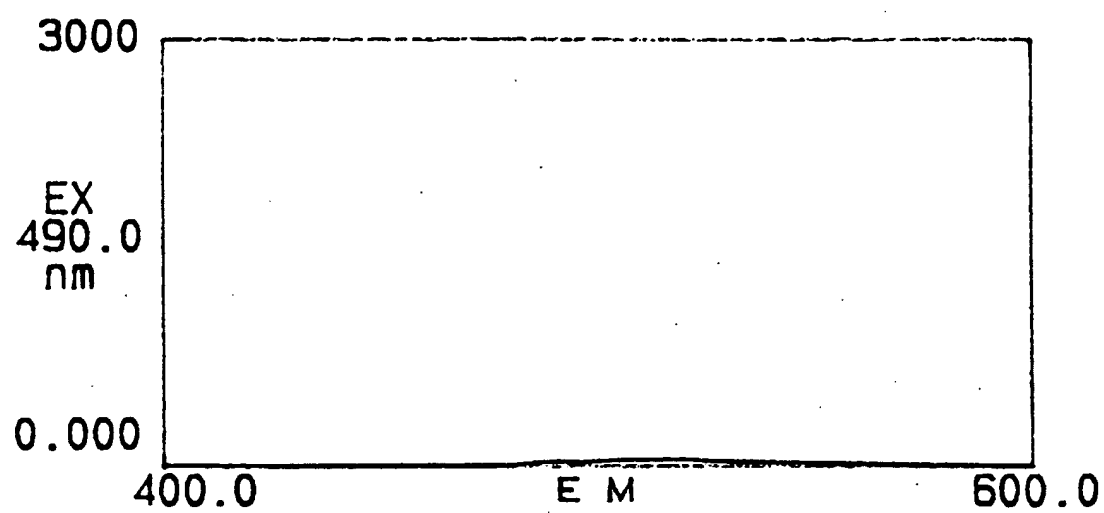
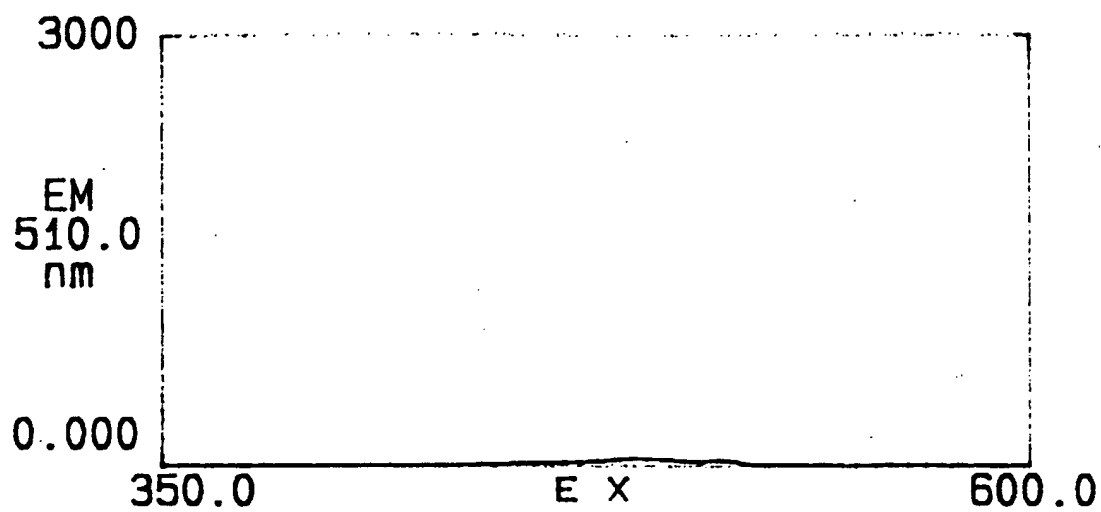
(B) 上記工程(A)で生成した脱アリール化合物又はその塩の蛍光を測定する工程を含む方法。

6. 酵素活性に活性酸素が関与する酵素の酵素活性を測定する方法であって、請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載の化合物又はその塩を用いる方法。

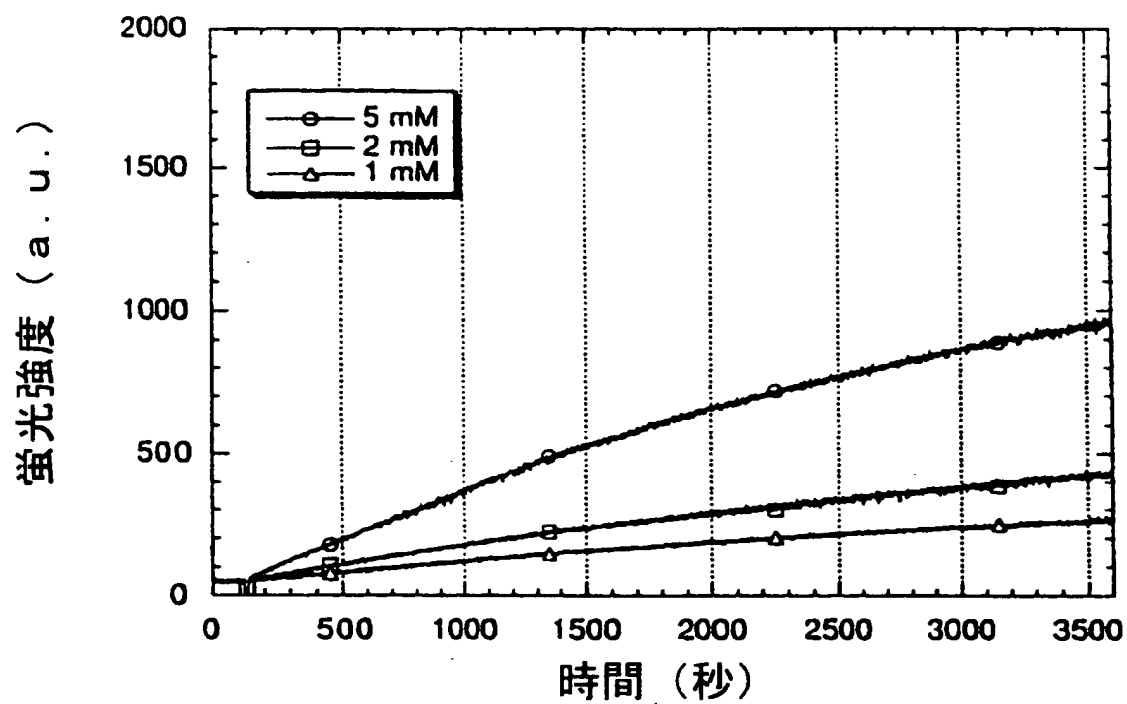
7. 酵素がペルオキシダーゼである請求の範囲第6項に記載の方法。
8. 酵素活性に活性酸素が関与する酵素の酵素活性を測定するための試薬であつて、請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載の化合物又はその塩を含む試薬。
9. 酵素がペルオキシダーゼである請求の範囲第8項に記載の試薬。



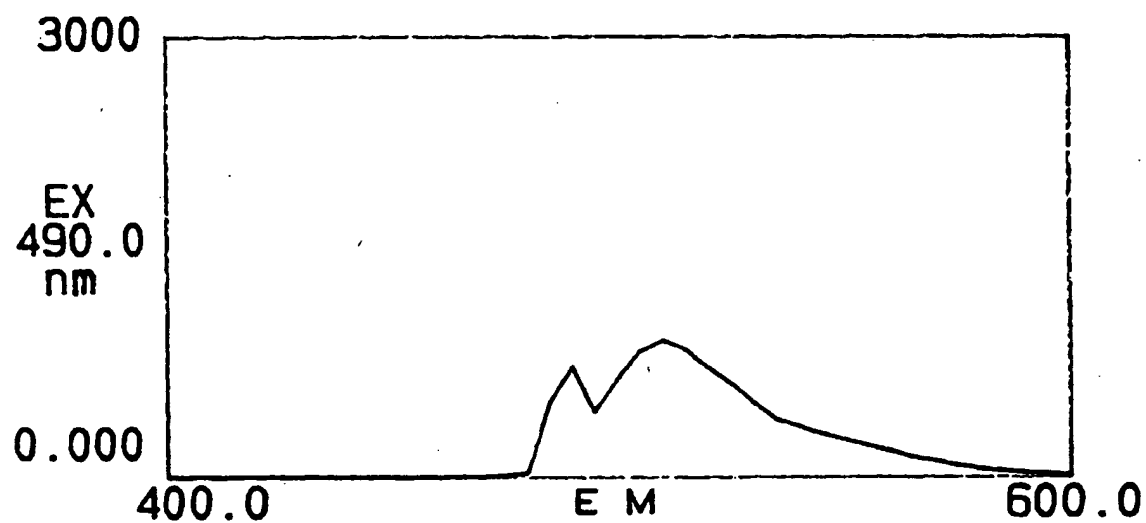
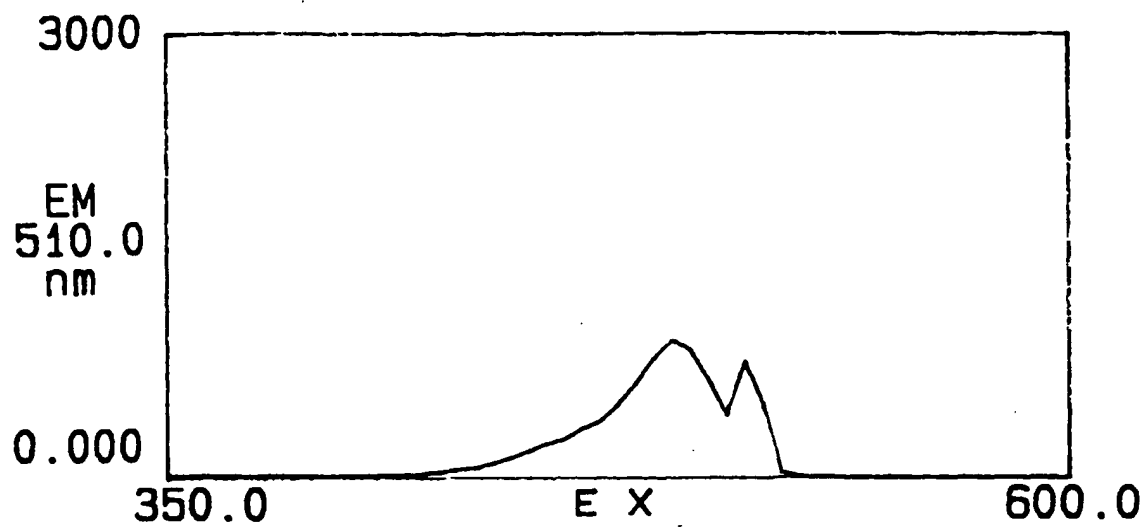
## 第1図



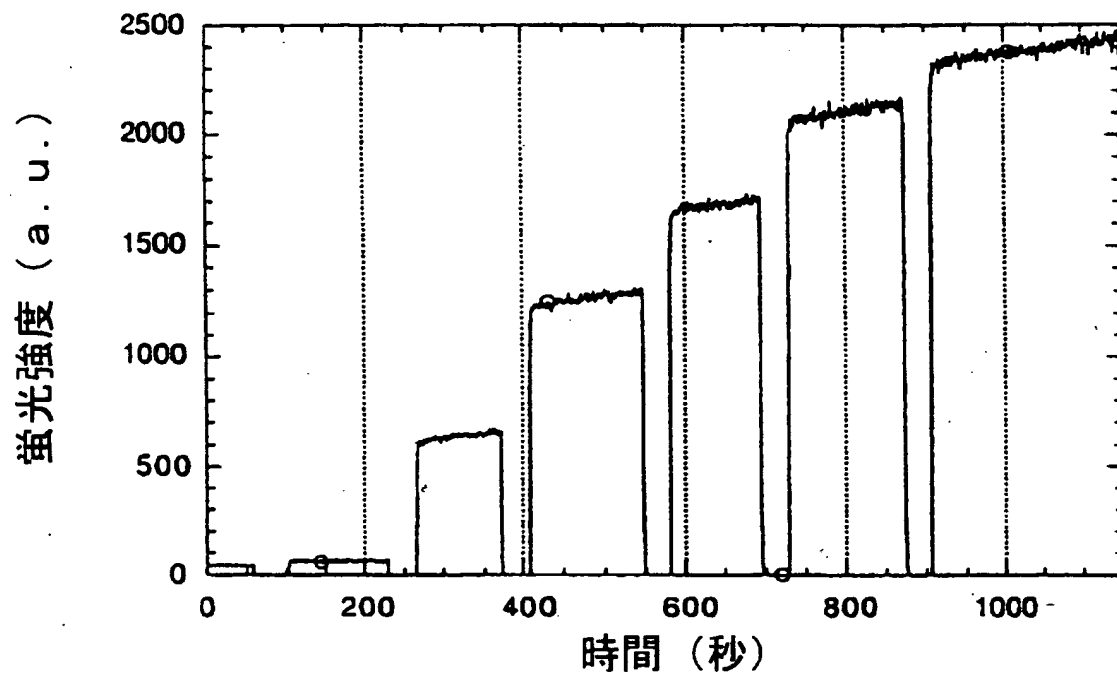
第2図



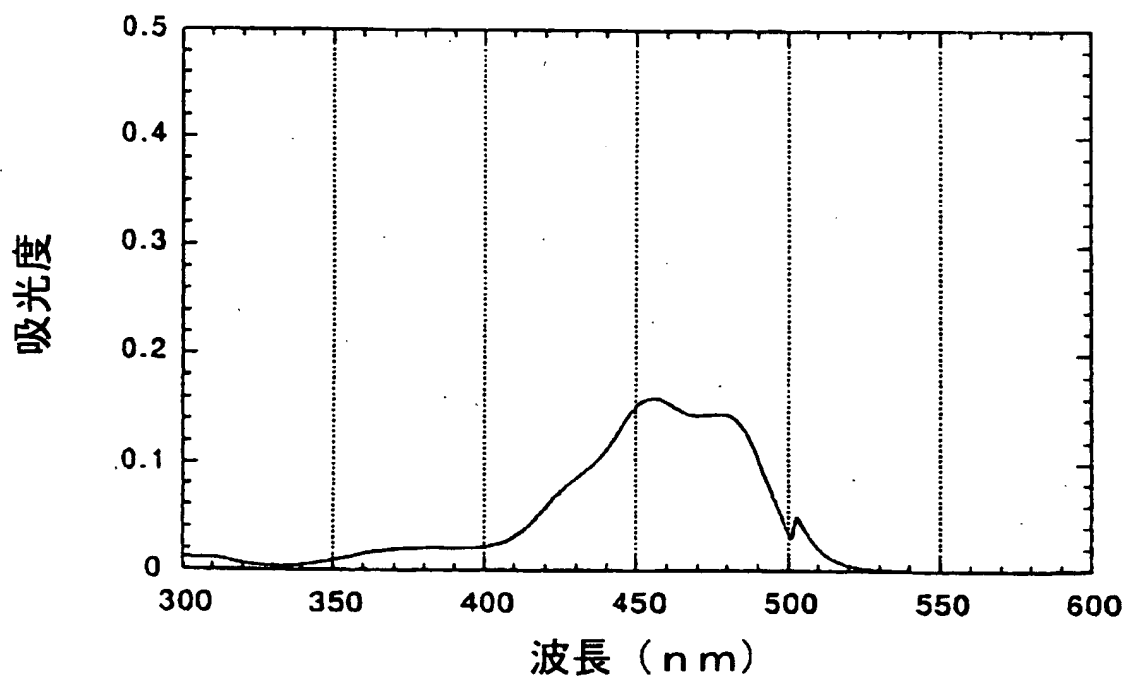
## 第3図



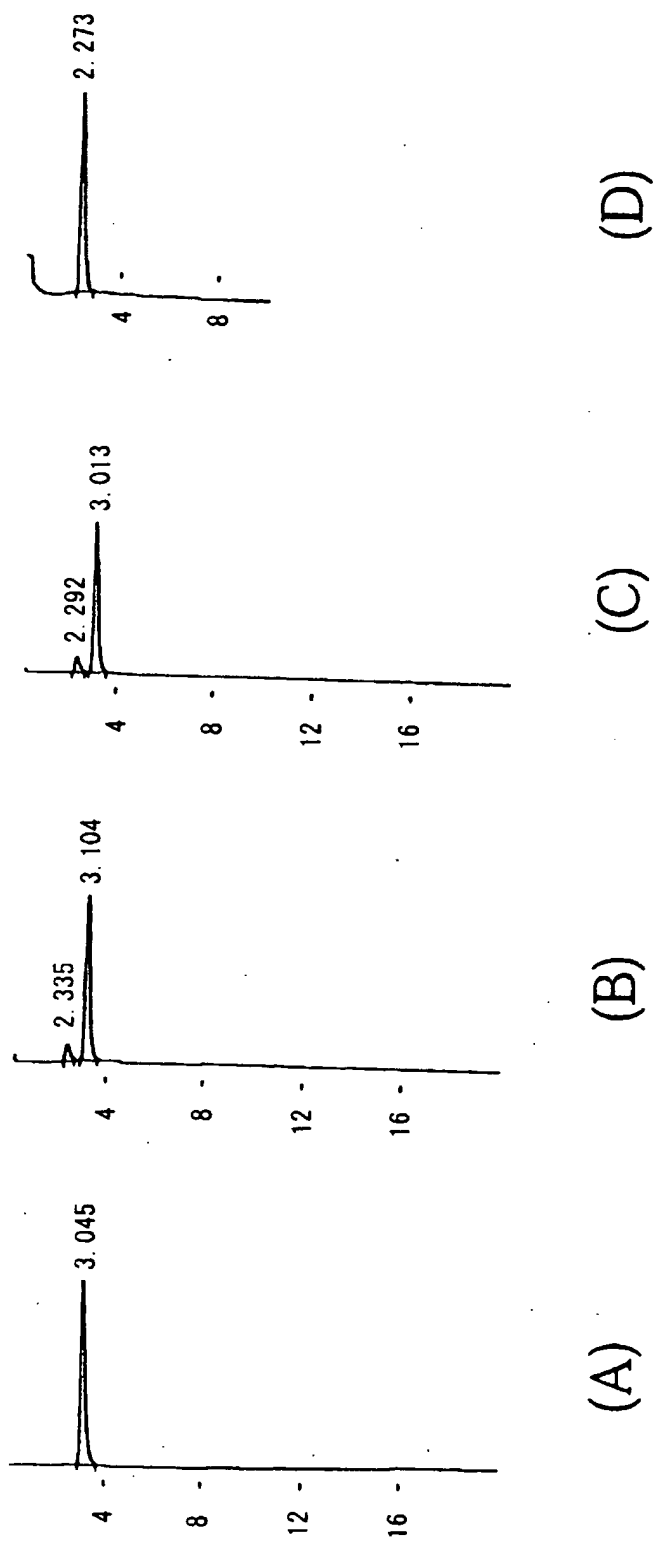
第4図



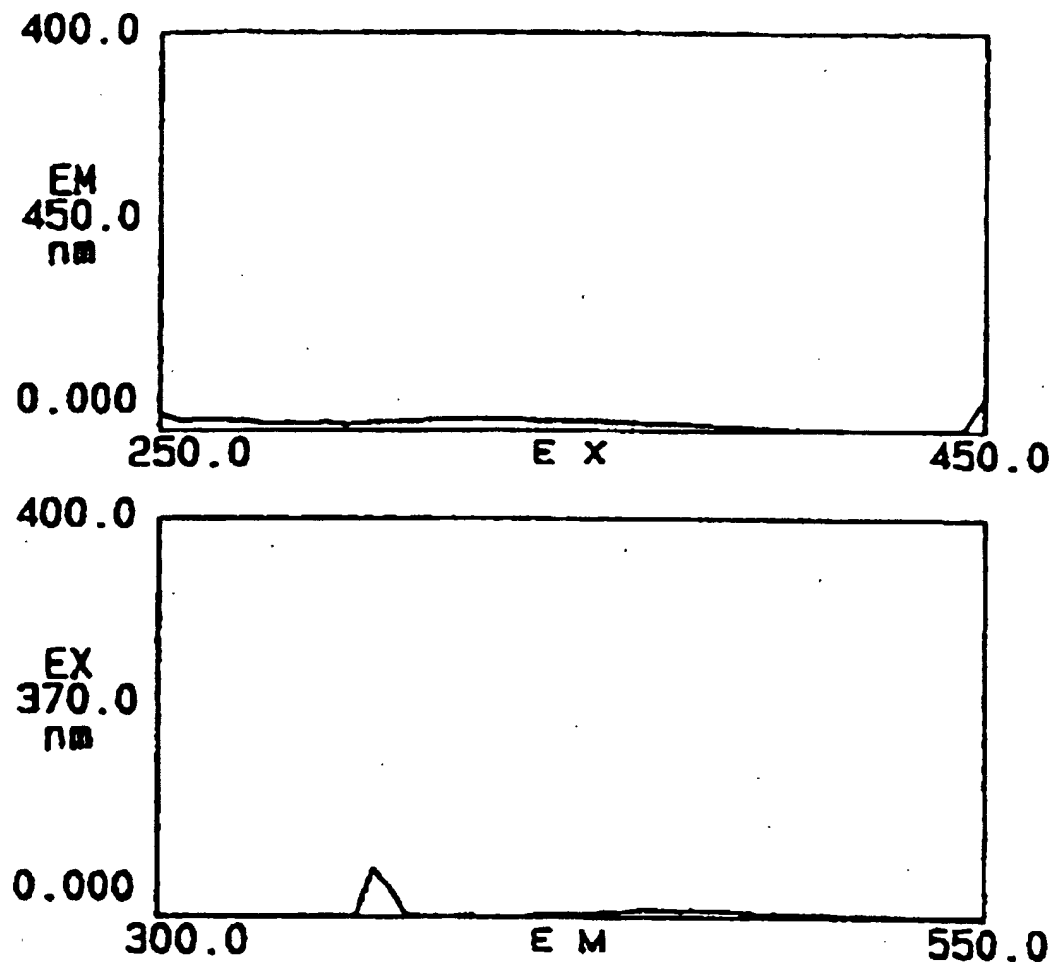
第5図



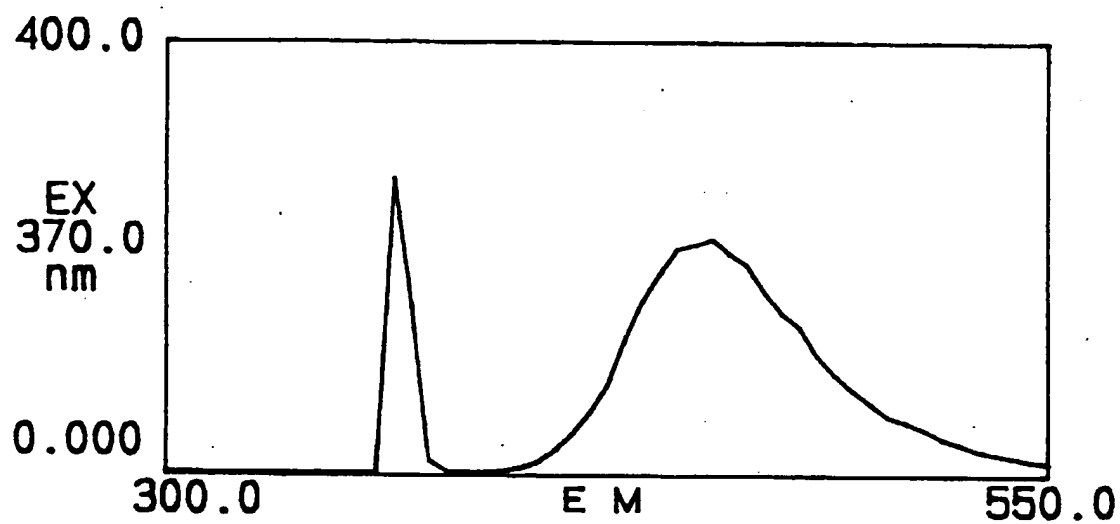
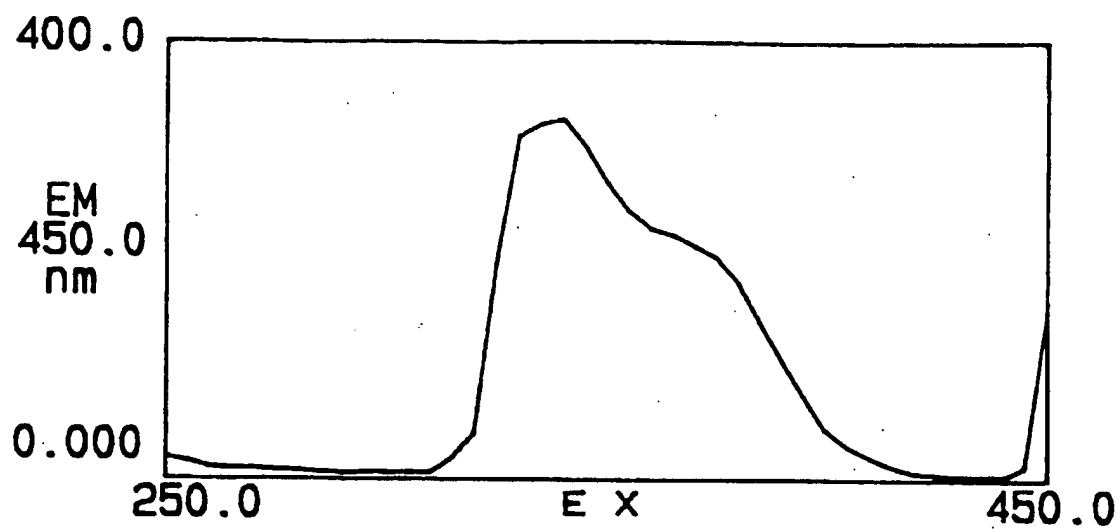
第6図



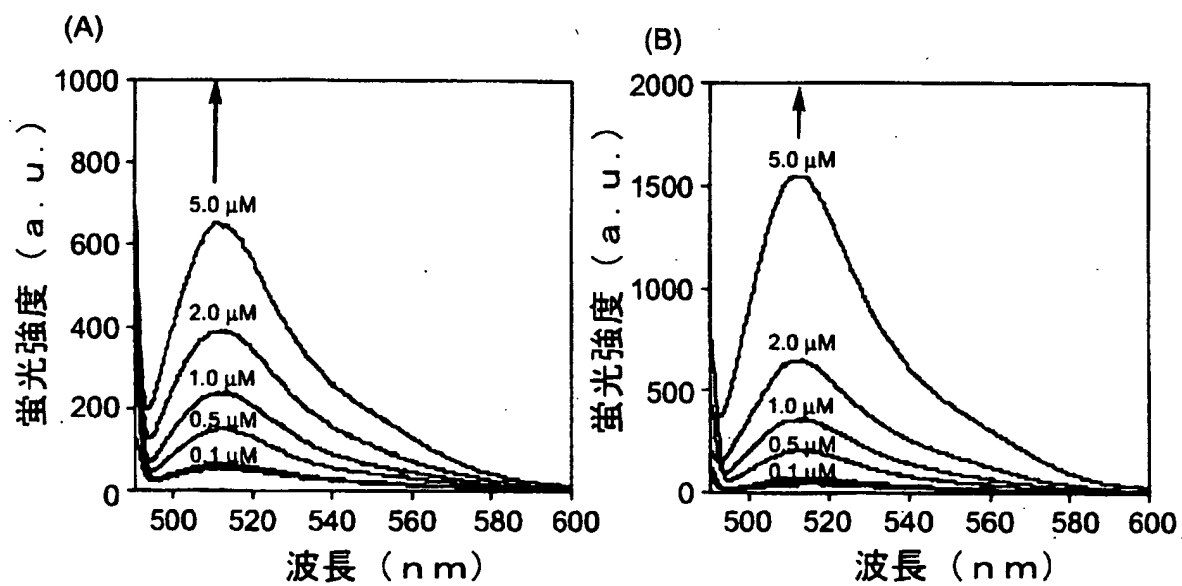
## 第7図



## 第8図



## 第9図





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01504

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07D311/16, C07D311/82, G01N31/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07D311/00-96, G01N31/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP, 515133, A2 (Spectra Group Ltd. Inc.), 25 November, 1992 (25.11.92), entire description & JP, 6-211831, A & WO, 95/14689, A1 & US, 5623080, A	1-9
A	JP, 60-54381, A (Mitsui Toatsu Chemicals Inc.), 28 March, 1985 (28.03.85), entire description (Family: none)	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
05 June, 2001 (05.06.01)Date of mailing of the international search report  
19 June, 2001 (19.06.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. ' C07D311/16, C07D311/82, G01N31/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. ' C07D311/00-96, G01N31/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP, 515133, A2 (Spectra Group Ltd. Inc.) 25. 11月. 1992 (25. 11. 92) 文献全体 &JP, 6-211831, A                      &WO, 95/14689, A1                      &US, 5623080, A	1-9
A	JP, 60-54381, A (三井東圧化学株式会社) 28. 3月. 1985 (28. 03. 85) 文献全体 ファミリーなし	1-9
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 05. 06. 01	国際調査報告の発送日 19.06.01	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 高岡 裕美 印	4 P 9737
電話番号 03-3581-1101		内線 3492